Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

DIE PH-ABHÄNGIGE MONOMERISATION VON DIMEREM THYMIN DURCH RÖNTGENSTRAHLEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ralf Förster
aus Dresden

1972

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

DIE PH-ABHÄNGIGE MONOMERISATION VON DIMEREM THYMIN DURCH RÖNTGENSTRAHLEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ralf Förster

aus Dresden

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Hartmann

Korreferent: Prof. Dr. med. Diether Neubert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6.Juli 1972.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsübersicht

		Seite
	Abkürzungen	6
1	Einleitung	7
1.1	DNS-Aufbau	7
1.2	Struktur von monomerem und dimerem Thymin	9
1.3	Allgemeine Strahlenwirkung	11
1.4	Einwirkung von UV-Strahlung auf Nucleinsäuren	13
1.5	Einwirkung von Röntgen-Strahlung auf Nucleinsäuren	14
1.6	Bisherige Arbeiten über die Bestrahlung von dimerem Thymin	14
2	Zielsetzung der eigenen Untersuchungen	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Herstellung von dimerem Thymin	19
3.1.1	UV-Bestrahlung	20
3.2	Spektralphotometrische Messungen	20
3.3	pH-Messungen	20
3.4	Röntgenbestrahlung	21
3.5	Pufferlösungen	21
3.6	Röntgen-Dosimetrie	22
3.7	UV-Dosimetrie	23
4	Eigene Versuchsergebnisse	24
4.1	Eichkurven zur spektralphotometrischen Bestimmung von monomerem und dimerem Thymin in wässrigen Lösungen	24

Seite

4.1.1 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von monomerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge 24

4.1.2 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von dimerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge 24

4.1.3 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von monomerem und dimerem Thymin in Abhängigkeit vom pH-Wert 26 a

4.1.4 Spektralphotometrische Bestimmung der prozentualen Anteile von monomerem und dimerem Thymin in wässrigen Lösungen 27

4.2 Ermittlung der Eichkurven für die prozentualen Anteile von monomerem und dimerem Thymin in wässrigen Lösungen 27

4.3 Fehlerrechnung und Bestimmung des Korrelationskoeffizienten 32

4.4 pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch Röntgenstrahlen in vitro 34

4.4.1 Bestimmung des Extinktions-Kurvenverlaufs bei der Spaltung von dimerem Thymin in Abhängigkeit vom pH-Wert 35

4.4.2 Der Einfluss verschiedener Pufferlösungen bezw. verschiedener Konzentrationen der Pufferlösungen auf die Spaltung des dimeren Thymins 38

4.4.3 Bestimmung der Faktoren, die einen Extinktionsanstieg nach Röntgen-Bestrahlung bewirken 40

4.5 Polynom-Näherung für die pH-abhängige strahleninduzierte Dimerenspaltung nach der Methode der kleinsten Fehler-Quadrate 41

5 Diskussion der eigenen Versuchsergebnisse 45

Seite

5.1 Eichkurven zur spektralphotometrischen Bestimmung von monomerem und dimerem Thymin in wässrigen Lösungen 45

5.2 pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch Röntgenstrahlen 46

5.3 Der Einfluss verschiedener Pufferlösungen bezw. verschiedener Konzentrationen der Pufferlösungen auf die Spaltung von dimerem Thymin 48

5.4 Bestimmung der Faktoren, die einen Extinktionsanstieg nach Röntgenbestrahlung bewirken 50

6 Zusammenfassung 52

7 Literaturnachweis 53

Abkürzungen

T	=	Thymin
TT	=	dimeres Thymin
DNS	=	Desoxyribonucleinsäure
RNS	=	Ribonucleinsäure

1 Einleitung

1.1 DNS-Aufbau

Durch das von Watson und Crick 1953 (1) aufgestellte Modell vom Aufbau der Nucleinsäure ist ein wichtiger Grundstein für weitere Arbeiten, nicht nur auf dem Gebiet der molekularen Biologie, sondern auch auf dem Gebiet der Medizin gelegt worden.

Die Bausteine der Nucleinsäure sind die Nucleotide, welche aus einer Purin- oder Pyrimidinbase, einer Pentose und Phosphorsäure bestehen. Je nach Art der Pentose, ob Desoxyribose oder Ribose erhält man zwei Formen der Nucleinsäuren: Desoxyribonucleinsäure (DNS) oder Ribonucleinsäure (RNS).

Wir unterscheiden drei Pyrimidinbasen:

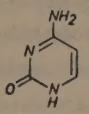
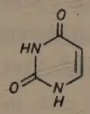
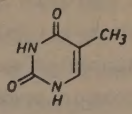

Abb.1: Cytosin Uracil Thymin

und drei Purinbasen:

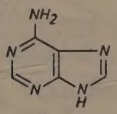
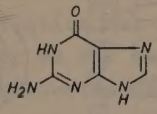
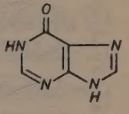

Abb.2: Adenin Guanin Hypoxanthin

Es ergibt sich dann die in Abb.3 dargestellte DNS-Einzelstrangstruktur:

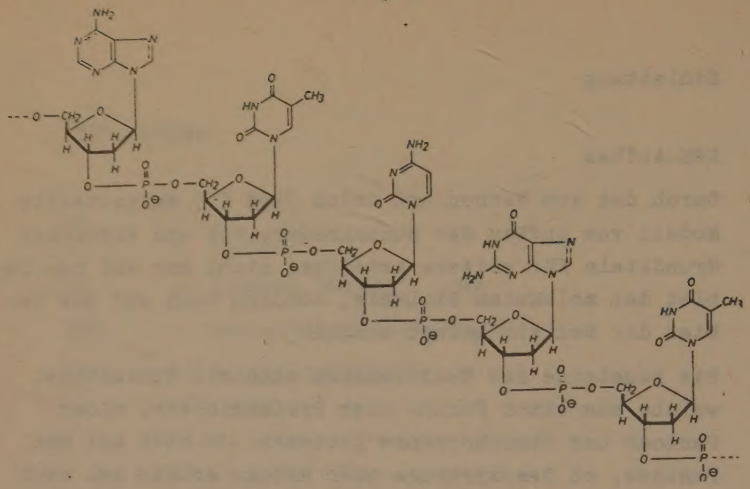

Abb.3: DNS-Einzelstrang (nach Karlson) (2)

Zwei Basen sind über H-Brücken miteinander verbunden. Es stehen immer Adenin und Thymin bezw. Guanin und Cytosin komplementär zusammen. Dadurch ergeben sich zwei Polynucleotidstränge, die schraubenartig umeinander gewunden sind und die DNS-Doppelhelixstruktur ergeben:

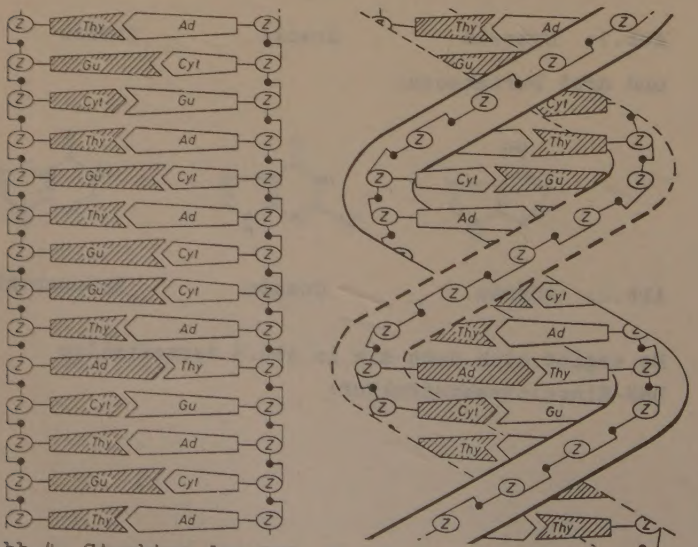

Abb.4: Struktur der DNS, Z = Zucker, · = Phosphorsäure (nach Karlson) (2)

Die Sequenz der Basen in der DNS stellt die genetische Information dar. Die Weitergabe dieser Information erfordert eine identische Reduplikation der DNS, wobei sich die H-Brücken zwischen den Basen lösen, und jeder Einzelstrang der Helix wirkt als Matritze für die Aufreihung der komplementären Basen. Jede Veränderung der Basensequenz bewirkt eine veränderte Information und somit eine Veränderung der betroffenen Zelle. Diese Veränderungen können spontan auftreten oder durch exogene Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. durch die Einwirkung von Pharmaka, UV-Licht oder ionisierender Strahlen.

1.2 Struktur von monomerem und dimerem Thymin

Beukers, Ijlstra und Berends (6), Rörsch (5) stellten fest, dass bei UV-Bestrahlung von DNS in wässriger Lösung ein Extinktionsverlust zu beobachten war. Daraus schlossen sie, dass eine photochemische Reaktion der Basen stattgefunden hat, bei der Strahlungsprodukte entstanden sind, die das UV-Licht nicht mehr in gleichem Masse absorbieren können. In gefrorener Thyminlösung kommt es zu einer Dimerisation des Pyrimidinringes (7). Die Dimerisation der Pyrimidine in vitro konnte von Wacker et al. bestätigt (45), sowie in vivo in der Bakterien-DNS nachgewiesen werden (5 21).

Die ersten Ergebnisse über die chemische Struktur der Photoprodukte konnten wiederum von Beukers und Berends 1960 (7) vorgewiesen werden. Durch Elementaranalyse, Molekulargewichts-Bestimmung, Kristallographie und IR-spektrographische Untersuchungen konnten die Autoren zeigen, dass sich zwei Thyminmoleküle der Lactamform (Abb.5) unter Aufhebung der Doppelbindung zwischen C_5 und C_6 sowie unter Ausbildung eines Cyclobutanringes

zu einem dimeren Thymin zusammenschliessen (Abb.6).

Abb.5: Lactimform Lactamform
Thymin

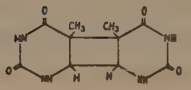

Abb.6: Thymindimeres

Durch Verwendung radioaktiv markierter Substanzen konnte von Weinblum 1961 (4) die photochemische Reaktion der in der Nucleinsäure vorkommenden Pyrimidine genauer untersucht werden.

Wulff und Fränkel (8), sowie Weinblum und Johns (29) zeigten, dass bei in vitro-Bestrahlung vier Isomere Thymindimere vorkommen, während in vivo nur mit der Konfiguration I (cis, syn) zu rechnen ist (Abb.7).

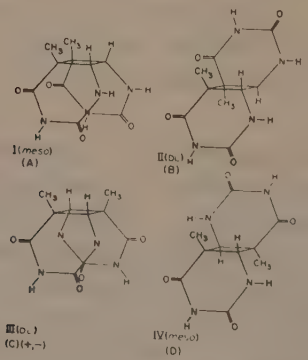

Abb.7: Vier stereoisomere Dimere des Thymins

1.3 Allgemeine Strahlenwirkung

Bei der Betrachtung der Strahlenwirkung sind zwei unterschiedliche Mechanismen zu betrachten. Der erste ist die direkte Strahlenwirkung, bei der die Absorption von Strahlenenergie im selben Molekül stattfindet, in dem auch die Schädigung auftritt. Der zweite ist die indirekte Strahlenwirkung, bei der die Veränderung durch den Angriff der bei der Bestrahlung entstehenden diffusiblen Radikale erfolgt. Der indirekte Effekt spielt eine Rolle bei der Einwirkung von Strahlen auf Biomoleküle, z.B. auf DNS, in wässrigen Lösungen. Bekannt ist, dass Röntgenstrahlen mit den Wassermolekülen reagieren, und zwar entstehen zunächst angeregte H_2O - Moleküle. Durch die Entfernung eines Elektrons als freies Elementarteilchen bildet sich das H_2O^+ - Ion. Die positiven Wassermoleküle zerfallen in OH-Radikale. Durch das Einfangen der bei der Ionisation herausgeschleuderten Elektronen kommen negative Ionen zustande. Dadurch werden $H^\bullet$ - Atome gebildet. Als biologisch wichtiges Endergebnis entstehen demnach freie $H^\bullet$ - Atome und $OH^\bullet$ - Radikale neben hydratisierten Elektronen.
Auf dieser Radikalbildung in wässriger Lösung beruht auch die Dosimetrie nach Fricke. Bei dieser Art der chemischen Dosimetrie reagieren Radikale aus der Radiolyse des Wassers mit Fe^{++}-Ionen unter Bildung von Fe^{+++}-Ionen. Letztere lassen sich durch Extinktionsmessung bei 305 nm quantitativ registrieren.

$$Fe^{++} + OH^\bullet \rightarrow Fe^{+++} + OH^-$$

Enthält eine wässrige Lösung Sauerstoff, wie es in den durchgeführten Versuchen durch das Rühren unter Luftzutritt der Fall war, so können sich

folgende Reaktionen abspielen (9):

$$H^{\cdot} + O_2 \rightarrow HO_2^{\cdot}$$

$$HO_2^{\cdot} + HO_2^{\cdot} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Es bildet sich unter diesen Bedingungen Wasserstoffperoxyd. Röntgenstrahlen wirken dabei oxydierend.

Die meisten strahlenchemischen Reaktionen sind pH-abhängig. Die Zahl der anwesenden H^+ - Ionen spielt eine Rolle bei der Ausbeute an Wasserradikalen. Jedoch fällt diese Abhängigkeit nur bei grossen oder kleinen pH-Werten ins Gewicht.

Von Baudisch et al. (10, 11) konnte nachgewiesen werden, dass Thymin mit Wasserstoffperoxyd reagiert. Dabei kann es zur Zerstörung des Pyrimidinringes kommen (Abb.8).

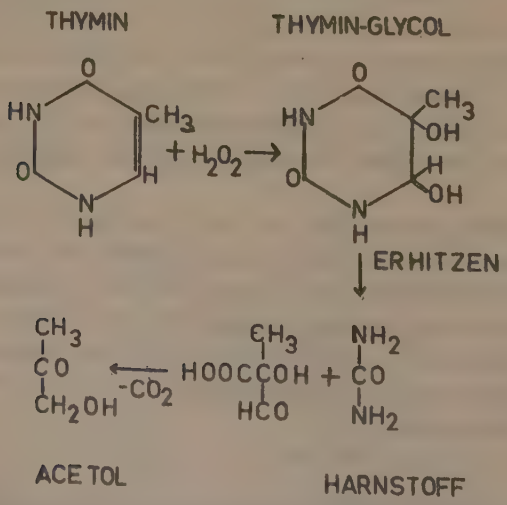

Abb. 8: Reaktion von Thymin mit Wasserstoffperoxyd

Wasserstoffperoxyd bewirkt bei der Einwirkung auf UV-inaktivierte Bakterien eine Reaktivierung.

Das konnte von Wacker und Gerstenberger (12) 1963 nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxyd und sichtbarem Licht wurde der grösste Reaktivierungs-Effekt erzielt.

1.4 Einwirkung von UV-Strahlung auf Nucleinsäuren

1962 berichteten Dellweg und Wacker (13), dass durch die Einwirkung von UV-Strahlen (254 nm) auf Bakterien und DNS eine Reihe von Photoprodukten gebildet wurden. Aus Thymin entstehen dimeres Thymin und mindestens zwei weitere Photoprodukte. Aus Cytosin entstehen Uracil und ebenfalls mindestens zwei weitere Photoprodukte. Nur das Thymindimere lässt sich durch Bestrahlung mit UV-Licht in wässriger Lösung zu 87% wieder in monomeres Thymin umwandeln, bei den übrigen Photoprodukten gelingt diese Reaktion nicht. Die Menge des Thymin-Photoproduktes in der DNS ist von der eingestrahlten UV-Dosis abhängig und hat einen Grenzwert, der je nach Bakteriengattung verschieden ist. Hier zeigt sich auch, dass nicht das gesamte Thymin der DNS in dimeres Thymin umgewandelt werden kann, da nur die Thyminmoleküle dimerisieren, die ein zweites Thymin in Nachbarschaft haben.
Bei Untersuchungen über die allgemeinen UV-Strahlenwirkungen in wässrigen Lösungen fanden 1958 Moor und Thomson (14), dass bei der Bestrahlung mit UV-Licht in wässrigen Lösungen eine Anlagerung von Wasser an die 5,6-Doppelbindung bei Pyrimidinen stattfand. Unter der Einwirkung ionisierender Strahlung dimerisiert Thymin nicht.

1.5 Einwirkung von Röntgen-Strahlung auf Nucleinsäuren

Weinblum (4) beschrieb 1961, dass bei Röntgen-Bestrahlung von Thymin sich in verdünnter Lösung unter Luftzutritt Thyminglycol bildete, welches teilweise in Harnstoff und Acetol zerfiel. Lochmann (15, 16) konnte 1962 zeigen, dass sich bei der Röntgen-Bestrahlung von radioaktiv markiertem Thymin Harnstoff und ein unbekanntes Strahlungsprodukt bildete. Er konnte durch Milieuveränderung nachweisen, dass der Grad der Zerstörung des Thymins immer geringer wurde, je mehr sich die Milieubedingungen den Verhältnissen in vivo näherten. In vivo wurde nach Bestrahlung ein Zerstörungseffekt festgestellt, der nur etwa 1% des Effektes bei Bestrahlung in vitro beträgt. Diese Ergebnisse zeigen, dass in der Zelle die für die Vererbung der Eigenschaften wichtigen Nucleinsäurebasen durch Zellsubstanzen, es sind hauptsächlich Proteine, vor der Wirkung der Strahlen geschützt werden.

1.6 Bisherige Arbeiten über die Bestrahlung von dimerem Thymin.

Beukers und Berends (7) vermuteten aufgrund massenspektrographischer Untersuchungsergebnisse eine Spaltbarkeit des dimeren Thymins durch Elektronenstrahlung. Dieses konnte von Schmidt, Hartmann, Grossgebauer und Schumacher 1963 (17) bei Versuchen mit schnellen Elektronen nachgewiesen werden. Das durch UV-Bestrahlung entstandene dimere Thymin wird durch Elektronenstrahlung teilweise wieder in monomeres Thymin gespalten. Von den gleichen Autoren (19) wurde eine Spaltung des dimeren Uracil in wässriger Lösung durch schnelle Elektronen beschrieben. Danach bestätigte Lochmann 1963 (16), dass auch durch Röntgenstrahlen teilweise

Thymin aus Thymindimeren entstand.
Nach Deering und Snipes 1968 (18) lässt sich eine schematische Darstellung der Thymindimeren-Spaltung durch ionisierende Strahlung in Gegenwart von O_2 oder N_2 geben.

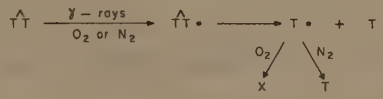

Abb. 9: Vereinfachtes Schema der Thymindimeren-Spaltung unter O_2- und N_2-Atmosphäre

Als Mass für den Umsatz von Substanzen bei Röntgen-Bestrahlung wird der G-Wert angegeben. Er ist gleich der Anzahl der Atome, die pro 100 e V absorbierter Energie reagieren. Der G-Wert ist stark konzentrationsabhängig und nimmt mit steigender Konzentration zu. Bei der Bestrahlung von dimerem Thymin in festem Zustand mit 100 Krad einer 60 Co - γ - Strahlung konnten Snipes und Deering 1968 (18) kein dimeres Thymin mehr, sondern nur noch monomeres Thymin feststellen. Für die Erzeugung der Thyminmoleküle wurde ein G-Wert von 1040 errechnet. Es wurde hierbei weniger Energie absorbiert als es den Bindungskräften im dimeren Thymin entsprechen würde. Ähnliche Ergebnisse wurden von Weinblum 1969 (2o) bei 60 Co - γ - Bestrahlung von Dimethylthymin in kristalliner Form gefunden. Er bestimmte die G-Werte für die vier stereoisomeren Formen. Für das cis-syn-Isomere fand er einen G-Wert von 6.300 im Kristall und von 1.000 im kristallinen Pulver. Der G-Wert fiel mit zunehmender Monomerisierung ab. Für die drei weiteren Isomere lagen die Werte niedriger.

Die biologische Bedeutung der Thymindimeren zeigt sich darin, dass mit abnehmender Überlebensrate bei Bakterien die Zahl der gebildeten Dimere

ansteigt (Wacker (21), Seltow (22)). Die Konsequenzen einer durch UV-Licht bewirkten Thymindimerisierung der DNS für die DNS-Replikation zeigten Bollum, Seltow (23):

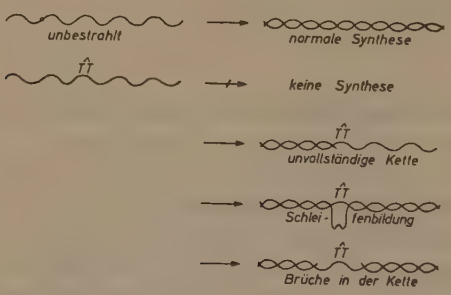

Abb. 10: Verschiedene diskutierte Konsequenzen einer durch UV-Licht bewirkten Thymindimerisierung der DNS für die DNS-Replication

Eine Basenvernetzung durch Stickstofflost, die als Ursache für mutagene und letale Effekte anzusehen ist, ist auch zwischen zwei verschiedenen DNS-Strängen möglich. Das fanden Brookes und Lawley 1961 (24), sowie Lawley und Brookes 1965 (25). Durch Stickstofflost (Abb.11) erfolgt eine Vernetzung zwischen zwei verschiedenen DNS-Strängen.
Als Molekülbrücke zwischen zwei DNS-Strängen kann auch Psoralen (Abb.12) eine Vernetzung bewirken. Die Vernetzung ist an das Vorhandensein konjugierter Doppelbindungen geknüpft. Dieses zeigten F.Dall'Acqua und Mitarbeiter 1970 (26).

Die Spaltung oder Eliminierung von dimerem Thymin oder anderer Pyrimidin-Photoprodukte, die als

Ursache für Genmutationen und verringerter biologischer Aktivität angesehen werden, durch schnelle Elektronen oder Röntgenstrahlen, ist neben den für die Zelle wichtigen Regenerationsmechanismen wie Photoreaktivierung, thermische Reaktivierung, Reaktivierung durch H_2O_2 oder Dunkelreaktivierung, von Bedeutung. So konnten Greulich, Hartmann und Schmidt 1968 (28) zeigen, dass bei Bakterien, die keine Dunkelreaktivierung zeigen, wie E.coli.B_{S-1}, durch Elektronenbestrahlung eine Thymindimerenspaltung hervorgerufen wird, die als Ursache für einen antagonistischen Effekt zwischen UV- und ionisierender Strahlung angesehen wird.(3)

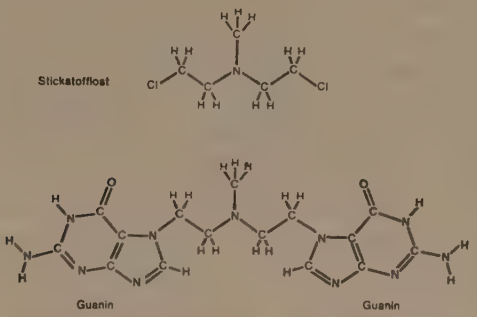

Abb. 11: Brückenbildung zwischen zwei Guaninmolekülen durch Stickstofflost (Hanawalt und Haynes 1967 (27))

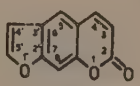

Abb. 12: Psoralen

2 Zielsetzung der eigenen Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit sollten experimentell ermittelte Eichkurven aufgestellt werden, aus denen der prozentuale Anteil von monomerem und dimerem Thymin durch Extinktionsmessung bei den Wellenlängen von 215, 234, und 264 nm abgelesen werden kann.
Weiterhin sollte die pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch 130 kV-Röntgenstrahlen untersucht werden.
Von verschiedenen Autoren wurden bei genauer Dosisangabe aber ohne exakte Angabe von pH-Wert und Fremdionenkonzentration unterschiedliche Spaltungsraten für Thymindimeres mitgeteilt.
Die vorliegenden Untersuchungen wurden deshalb durchgeführt, um mögliche Ursachen für unterschiedliche Ausmasse der Thymindimeren-Spaltung bei konstanter Dosis zu ermitteln.

3 Material und Methoden:

3.1 Herstellung von dimerem Thymin

Zur Gewinnung von dimerem Thymin wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

a) Nach den Angaben von Deering und Snipes (18) wurden 50,3 ml einer 1%igen Thyminlösung (Thymin für biochemische Zwecke in kristalliner Form von Fa.Merck, Mol.-Gew.126,12) in Glas-Petrischalen mit einem Durchmesser von 17,9 cm eingefüllt. Nach $V = \pi r^2 h$ befindet sich in einer Petrischale dieses Durchmessers eine Schicht von der Dicke $h = 2$ mm. Der Inhalt von 4 Schalen wurde auf Trockeneis eingefroren und mit einer UV-Lampe 60 min im Abstand (Röhre - Oberfläche der Lösung) von 7 cm bestrahlt. Die Lösung wurde danach aufgetaut, auf 100° C erhitzt, und bei Raumtemperatur über Nacht stehengelassen. Die entstandenen, weissen, stäbchenförmigen Kristalle wurden durch Filtration gesammelt und im Lösungsmittel erhitzt bis sie vollständig gelöst waren. Als Lösungsmittel wurde Aqua tridest verwandt, welches vorher auf 100° C erhitzt und mit einem Sartorius Membranfilter SM 11307 filtriert worden war. Die Umkristallisation wurde fünfmal wiederholt, danach wurden die entstandenen Kristalle getrocknet. Es wurden wässrige Lösungen mit 5, 10, 15, 20 und 25 µg Thymin pro ml hergestellt und diese spektralphotometrisch im Bereich von 200 - 300 nm gemessen.
Nach dieser Methode betrug die Ausbeute an dimerem Thymin aus einer 1%igen monomerem Thyminlösung nur 60 - 70%. Die von Deering und Snipes (18) beschriebene Methode wurde deshalb modifiziert.

b) Eine wässrige Lösung von 400 µg Thymin pro ml

(pH-Wert 5,5) wurde auf eine Glasplatte mit erhöhten Rändern und den Abmessungen 79,6 cm x 20 cm = 1592 cm^2 gebracht. Die Schichtdicke wurde von 2 mm auf 1,57 mm reduziert. Bei einem Abstand UV-Röhre - Glasplatte von 6 cm wurde die auf Trockeneis eingefrorene Lösung mit 1,16 x 10^6 erg/mm^2 UV-Licht von vorwiegend 254 nm bestrahlt. Die weitere Behandlung wurde wie oben durchgeführt. Die Ausbeute an TT lag bei ca. 90%. Nach 4- 5maliger Umkristallisation konnte TT hergestellt werden, welches weniger als 1% T enthielt.

3.1.1 UV-Bestrahlung

Als UV-Strahler wurde eine Quecksilber-Niederdrucklampe NK 30/89 - PL 390 der Quarzlampengesellschaft Hanau, 0,35 Amp, 220 V verwendet, der vorzugsweise Licht der Wellenlänge 253,7 nm abgibt. Die Röhrenlänge betrug 80 cm.

3.2 Spektralphotometrische Messungen

Als Spektralphotometer diente das Gerät PMQ II der Fa. Carl Zeiss. Es wurde die Wasserstofflampe H 30 ohne Filter benutzt.
Als Küvetten wurden Quarzküvetten QS von 1,00 cm Schichtdicke verwendet.

3.3 pH-Messungen

Zur pH-Messung wurde das pH-Meter Type E 150 A Metrohm A.G.,Herisau, Schweiz verwendet. Zur Eichung wurden Pufferlösungen der Fa. Merck benutzt:
Phosphat-Natronlauge-Pufferlösung pH 11,00 (0,025 M),
Phosphat-Pufferlösung pH 6,88 (0,025 M),
Standardacetat-Pufferlösung pH 4,62 (0,2 M).
Die Proben wurden in einem 4 cm hohen Reagenzglas von 13 mm Durchmesser gemessen.

3.4 Röntgenbestrahlung

Das Röntgengerät war vom Typ Müller MG 150, Röntgenröhre MÖD 151/Be.
Bedingungen: Es wurde mit 130 kV, 13,5 mA ohne Filter mit grossem Brennfleck bestrahlt.
Der Abstand Brennfleck - Oberfläche der Lösung betrug 121 mm. Die Proben wurden magnetisch gerührt. Als Bestrahlungsgefässe wurden Kunststoff-Petrischalen von 5,3 cm Durchmesser verwendet. Es ergab sich bei 10 ml Lösung eine Schichthöhe von 4,9 mm.

3.5 Pufferlösungen

Zur pH-Einstellung wurden Pufferlösungen nach Angaben in den "Wiss.Tabellen Geigy" (30) hergestellt.
Citrat-Phosphat-Borat-Lösung (A) und 0,1 n HCl (B) für pH 3 - 12 nach Theorell und Stenhagen.

pH	A (ml)	B (ml)
3	20	56,5
4	20	50,5
5	20	45,18
6	20	39,42
7	20	32,65
8	20	28,02
9	20	23,75
10	20	17,92
11	20	14,52
12	20	0,40

Weiterhin 0,1; 0,2; 0,3 n HCl/KCl-Puffer nach Clark und Lubs.

Die zur Bestrahlung kommenden Lösungen enthielten 17,1 µg TT pro ml, d.h. es wurden 30 ml einer

Lösung mit 20 µg TT pro ml mit 5 ml des jeweiligen Puffers gemischt.

3.6 Röntgen-Dosimetrie

Die Röntgen-Dosismessung wurde nach der Methode von Fricke durchgeführt. Unter genauer Beibehaltung der Versuchsanordnung wurden die zu bestrahlenden TT-Lösungen ersetzt durch eine Lösung von 10^{-3} molar $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ und 10^{-3} molar NaCl in 0,1 n H_2SO_4.

Die Lösungen wurden gerührt und nach der Bestrahlung die Extinktionsänderungen bei 305 nm gemessen. Die Extinktionen wurden in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit aufgetragen.

Die Dosisleistung wurde berechnet nach der Formel:

$$D = \frac{1{,}602 \times 10^{-15} \times N \times E}{E_M \times D \times G} \quad \text{(rad)}$$

$1{,}602 \times 10^{-15}$ = Umrechnungsfaktor eV in erg x 10^{-3}

N = Loschmidtsche Zahl 6,02 x 10^{23} mol^{-1}

E = bei 25° C gemessene Extinktion

E_M = molare Extinktion von Fe^{+++} gemessen in 0,1 n H_2SO_4 bei 25° C = 2190

D = relative Dichte von 0,1 n H_2SO_4 bei 25° C = 1,00 g/ml

G = radiochemische Ausbeute = 14,5 Ionen Fe^{+++} pro 100 eV

Bei einer Einstellung von 130 kV und 13,5 mA wurde eine Dosisleistung des Röntgengerätes von 119 rad/sec gemessen bezw. errechnet.

3.7 UV-Dosimetrie

Für die UV-Dosismessung wurden im Labor vorhandene Eichkurven übernommen. Die Dosis-Messmethode beruht auf der Umwandlung von UV-Licht in eine Fluoreszenz-Strahlung unter Verwendung von Uramine A. Die Fluoreszenz-Strahlung wurde photoelektrisch gemessen.
Bei einem Abstand von 6 cm ergaben sich $1{,}7 \times 10^4$ erg/min x mm^2. Für 70 min UV-Bestrahlung = $1{,}16 \times 10^6$ erg/mm^2.

4 Eigene Versuchsergebnisse

4.1 Eichkurven zur spektralphotometrischen Bestimmung von monomerem und dimerem Thymin in wässrigen Lösungen

4.1.1 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von monomerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge

In Abbildung 13 ist die Extinktion von monomeren Thyminlösungen unterschiedlicher Konzentration in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen. Um spektralphotometrisch messbare Werte im Anzeigebereich des verwendeten Gerätes zu erhalten, wurden die Extinktionsverläufe wässriger Thyminlösungen von 5, 10, 15, 20 und 25 µg Thymin pro ml aufgenommen. Der pH-Wert betrug ungepuffert 5,5 und es wurde bei einer Temperatur von 23°C±1 gemessen. Der Kurvenverlauf stimmt mit den aus der Literatur bekannten Werten (31) überein. Die Extinktions-Maxima liegen bei 264 nm, die Minima bei 234 nm.

4.1.2 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von dimerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Von der kristallinen Substanz des dimeren Thymins wurden wässrige Lösungen mit 5, 10, 15, 20, 25 und 100 µg TT pro ml spektralphotometrisch gemessen. Abbildung 14 zeigt die Abhängigkeit der Extinktion von der Wellenlänge der sechs verschiedenen dimeren Thyminkonzentrationen. Das Diagramm stimmt mit den Ergebnissen von Beukers et al.(7) überein. Es zeigt, dass bei einer Wellenlänge von 264 nm im Vergleich zu monomerem Thymin kein Extinktions-Maximum zu messen war. Dies bedeutet gleichzeitig, dass keine nachweisbare Menge von monomerem Thymin in der Lösung vorhanden war.

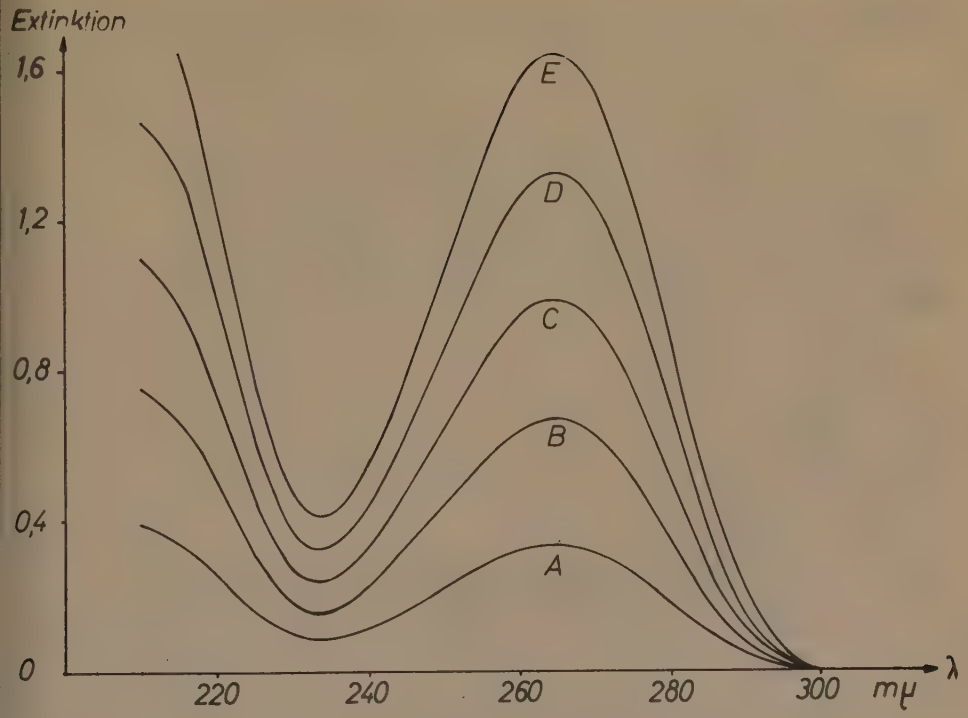

Abb.13: Die Abhängigkeit der Extinktion (Ordinate) von monomeren Thyminlösungen als Funktion der Wellenlänge (Abszisse).

Kurve A = 5 µg/ml T
" B = 10 µg/ml T
" C = 15 µg/ml T
" D = 20 µg/ml T
" E = 25 µg/ml T
pH = 5,5
Temperatur = 23°C±1
Die Messpunkte haben am Maximum bezw. Minimum einen Abstand von 2 nm, bei den übrigen Kurvenabschnitten einen von 5 nm. Sie liegen direkt auf den gezeichneten Kurven.

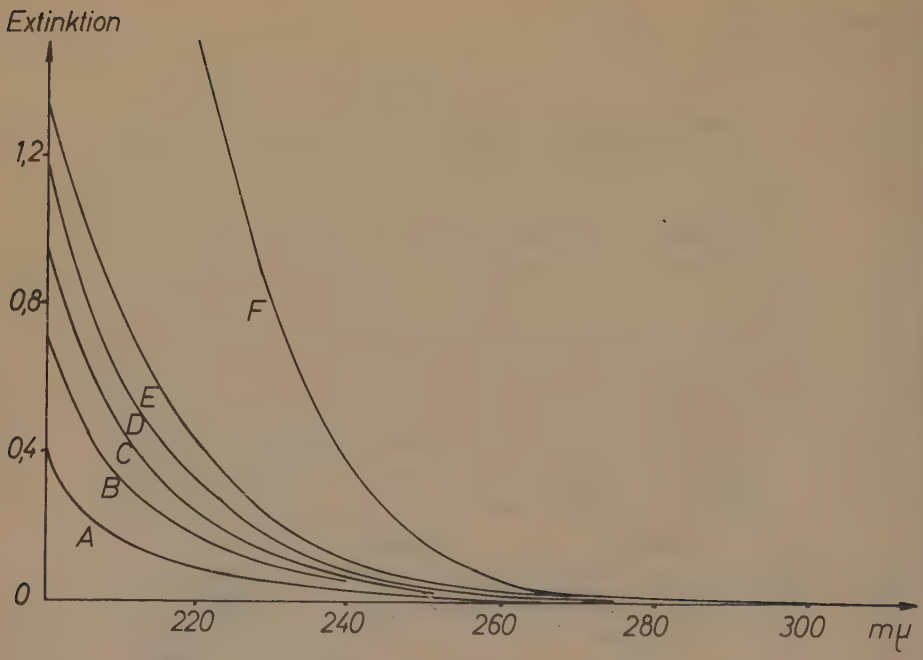

Abb.14: Die Abhängigkeit der Extinktion (Ordinate) von dimeren Thyminlösungen als Funktion der Wellenlänge (Abszisse)

Kurve A = 5 µg/ml TT
" B = 10 µg/ml TT
" C = 15 µg/ml TT
" D = 20 µg/ml TT
" E = 25 µg/ml TT
" F = 100 µg/ml TT
pH = 5,5
Temperatur = 23°C±1

Die Messpunkte haben bei 230 nm - 240 nm und bei 260 nm - 270 nm einen Abstand von 2 nm, bei den übrigen Kurvenabschnitten einen von 5 nm. Sie liegen direkt auf den gezeichneten Kurven.

4.1.3 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von monomerem und dimerem Thymin in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Extinktionen von T und TT sind pH-abhängig. Die Abbildung 14 a zeigt, dass bei pH-Werten > 9,0 für T bezw. 9,9 für TT eine Erniedrigung für T bezw. eine Erhöhung der molaren Extinktion für TT stattfindet. Diese Änderungen im alkalischen pH-Bereich wurden bei der Konzentrationsbestimmung berücksichtigt.

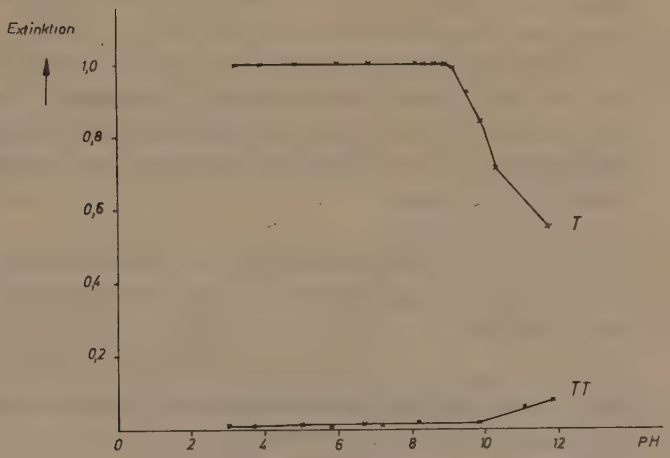

Abb.14 a: Die Abhängigkeit der Extinktion (Ordinate) von Lösungen des monomeren und dimeren Thymins (17,1 µg/ml) vom pH-Wert der Lösung. Die pH-Einstellungen erfolgten mit Citrat-Phosphat-Borat-Puffer nach Theorell und Stenhagen. Temperatur = 23°C±1

4.1.3 Spektralphotometrische Bestimmung der prozentualen Anteile von monomerem und dimerem Thymin in wässrigen Lösungen

Es wurden wässrige Lösungen von monomerem und dimerem Thymin in den Konzentrationen 5, 10, 15, 17,1, 20 und 25 µg hergestellt. In mehreren Verdünnungsreihen wurden 10% bis 90%ige Lösungen der beiden Substanzen in Intervallen von jeweils 10% hergestellt und so miteinander gemischt, dass die Summe der beiden Prozentgehalte 100% erga_b. Die Gemische wurden bei den Wellenlängen 215, 234 und 264 nm spektralphotometrisch gemessen. In den Abbildungen 15a - c sind die Extinktionen in Abhängigkeit von den prozentualen Mengen an dimerem Thymin aufgetragen.

4.2 Ermittlung der Eichkurven für die prozentualen Anteile von monomerem und dimerem Thymin in wässrigen Lösungen

In Abbildung 16 sind die Extinktionen in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration an dimerem und monomerem Thymin dargestellt.

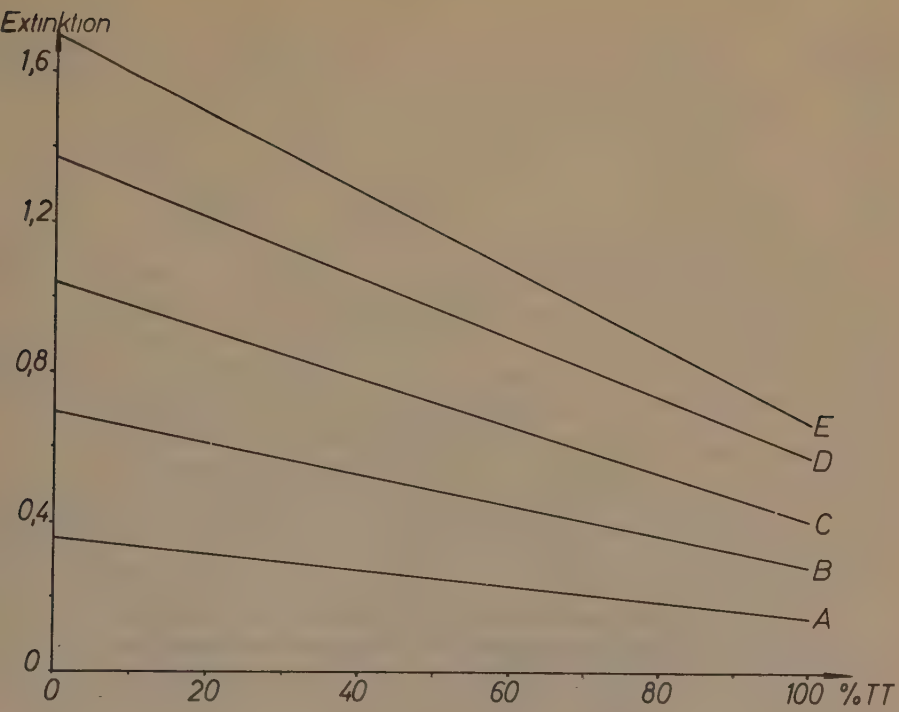

Abb.15 a: Die Abhängigkeit der Extinktion (Ordinate) vom Mischungsverhältnis aus monomerem und dimerem Thymin (Abszisse) für verschiedene Konzentrationen

Kurve A = 5 µg/ml T + TT
" B = 10 µg/ml T + TT
" C = 15 µg/ml T + TT
" D = 20 µg/ml T + TT
" E = 25 µg/ml T + TT
pH = 5,5
Temperatur = 23°C±1
Wellenlänge =215 nm
Die Messpunkte haben einen Abstand von 10% TT und liegen auf den gezeichneten Kurven.

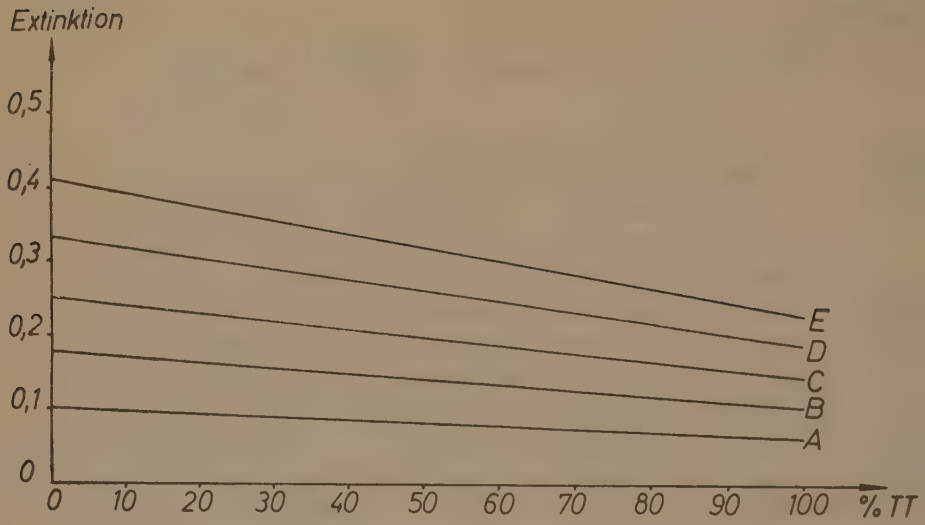

Abb.15 b: Die Abhängigkeit der Extinktion (Ordinate) vom Mischungsverhältnis aus monomerem und dimerem Thymin (Abszisse) für verschiedene Gesamtkonzentrationen

Kurve A	=	5 µg/ml T + TT
" B	=	10 µg/ml T + TT
" C	=	15 µg/ml T + TT
" D	=	20 µg/ml T + TT
" E	=	25 µg/ml T + TT
pH	=	5,5
Temperatur	=	23°C±1
Wellenlänge	=	234 nm

Die Messpunkte haben einen Abstand von 10% TT und liegen direkt auf den gezeichneten Kurven.

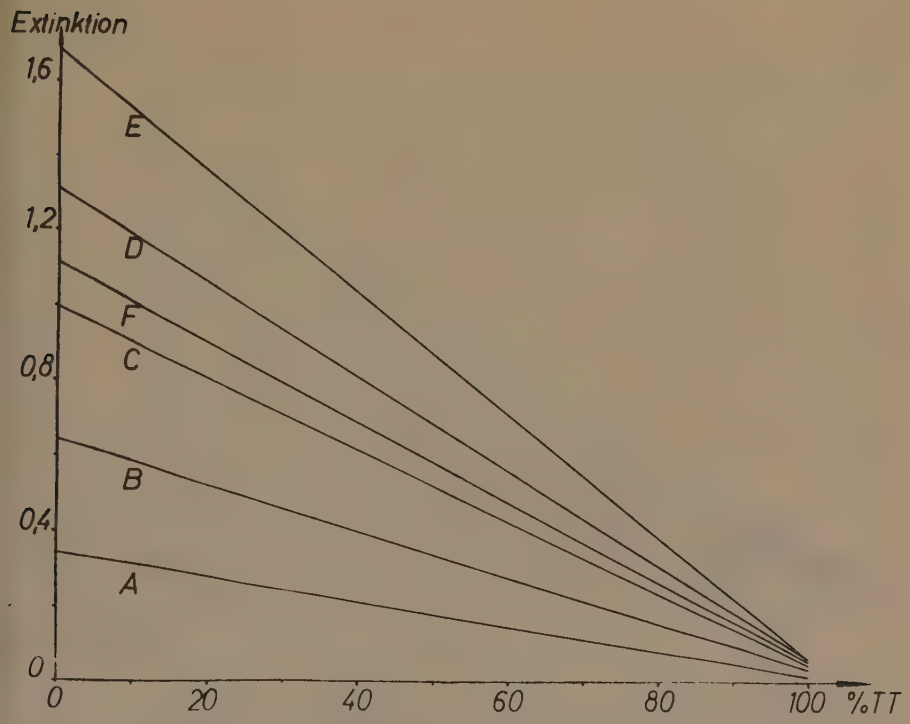

Abb.15 c: Die Abhängigkeit der Extinktion (Ordinate) vom Mischungsverhältnis aus monomerem und dimerem Thymin (Abszisse) für verschiedene Gesamtkonzentrationen

Kurve A	=	5 µg/ml T + TT
" B	=	10 µg/ml T + TT
" C	=	15 µg/ml T + TT
" D	=	20 µg/ml T + TT
" E	=	25 µg/ml T + TT
" F	=	17,1µg/ml T + TT
pH	=	5,5
Temperatur	=	23°C±1
Wellenlänge	=	264 nm

Die Messpunkte haben einen Abstand von 10% TT und liegen direkt auf den gezeichneten Kurven.

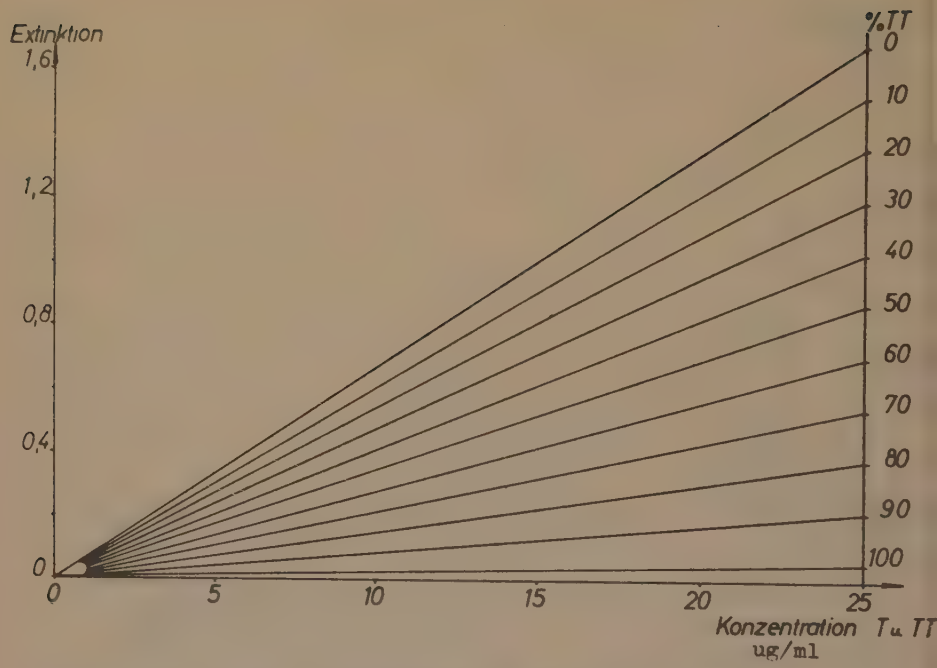

Abb. 16: Die Abhängigkeit der Extinktion (linke Ordinate) von der Gesamtkonzentration an monomerem und dimerem Thymin (Absziss). In der rechten Ordinate sind die prozentualen Anteile an dimerem bezw. monomerem Thymin aufgetragen, die die jeweils gemessenen Extinktionen hervorrufen. Wellenlänge = 264 nm

Beispiel: Bei Kenntnis einer Extinktion von E = 0,3 bei der Wellenlänge 264 nm einer Probe und einer Gesamtkonzentration von 11 µg/ml beträgt der Anteil an TT 60% und an T 40%.

4.3 Fehlerrechnung und Bestimmung des Korrelationskoeffizienten

Für die Fehlerrechnung wurde die Konzentration von 17,1 µg/ml für monomeres und dimeres Thymin ausgewählt, da diese für die weiteren Untersuchungen verwendet worden ist. Es wurden wässrige monomere und dimere Thyminlösungen von der Konzentration 17,1 µg/ml T + TT hergestellt. In einer Verdünnungsreihe wurden 10 bis 90%ige Lösungen der monomeren und dimeren Thyminsubstanzen hergestellt und so miteinander gemischt, dass die Summe der beiden Gehalte 100% ergab. Die Gemische wurden bei der Wellenlänge 264 nm spektralphotometrisch gemessen. Für jeden Messpunkt wurden 10 Proben untersucht. Tabelle I zeigt die Versuchsergebnisse.

	Versuche Nr.									
TT (%)	1 (E)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1,126	1,126	1,116	1,176	1,116	1,136	1,116	1,116	1,126	1,116
10	1,010	0,955	1,066	1,026	0,995	1,000	1,066	0,996	1,020	1,000
20	0,945	0,855	0,966	0,906	0,884	0,893	0,945	0,885	0,880	0,940
30	0,864	0,753	0,866	0,799	0,799	0,787	0,873	0,805	0,799	0,847
40	0,690	0,621	0,726	0,691	0,687	0,658	0,714	0,694	0,705	0,690
50	0,603	0,534	0,620	0,588	0,599	0,593	0,604	0,594	0,603	0,593
60	0,478	0,445	0,518	0,493	0,498	0,491	0,503	0,504	0,445	0,490
70	0,405	0,336	0,372	0,367	0,363	0,323	0,383	0,388	0,367	0,388
80	0,280	0,238	0,266	0,256	0,251	0,245	0,280	0,289	0,270	0,251
90	0,148	0,127	0,138	0,144	0,144	0,125	0,171	0,192	0,170	0,127
100	0,003	0,020	0,015	0,012	0,016	0,016	0,012	0,018	0,010	0,009

Tab.I: Extinktion (E) der Gemische aus T und TT (TT%)

Aus den 110 Einzelwerten der Tabelle I wurde mit Hilfe eines Computers (General Elektric, Honeywell-Bull, Time-Sharing-Service, System Mark I) die Gleichung der Regressionsgeraden bestimmt:

$y = a_1 x + a_o$

y = Extinktion

x = TT %

E = -0,010958 x TT % + 1,13216 (Formel 1)

Der zugehörige Korrelationskoeffizient betrug

r = -0,997047.

Der Korrelationskoeffizient ist eine Masszahl, deren Absolutbetrag - bei annähernd linearem Zusammenhang zwischen abhängiger und unabhängiger Messgrösse - den Grad dieses Zusammenhanges beschreibt. Der Korrelationskoeffizient liegt zwischen -1 und +1; er ist 0, wenn keine Korrelation besteht. Er ist ± 1, wenn alle Punkte genau auf einer Geraden liegen. Das positive Vorzeichen beschreibt positive Korrelation, bei der beide Messgrössen gleichsinnig wachsen, während bei einer negativen Korrelation der eine Wert abnimmt, wenn der andere zunimmt.
Daher konnte mit Hilfe des Student-Testes statistisch gesichert werden, dass zwischen TT % und der Extinktion ein Zusammenhang besteht. Die Wahrscheinlichkeit wurde mit 99,9 % (Tabelle Geigy (30)) ermittelt.
Der nach Formel 1 ermittelte Kurvenverlauf für eine Gesamtkonzentration von 17,1 µg/ml T + TT ist in Abbildung 17 aufgetragen.

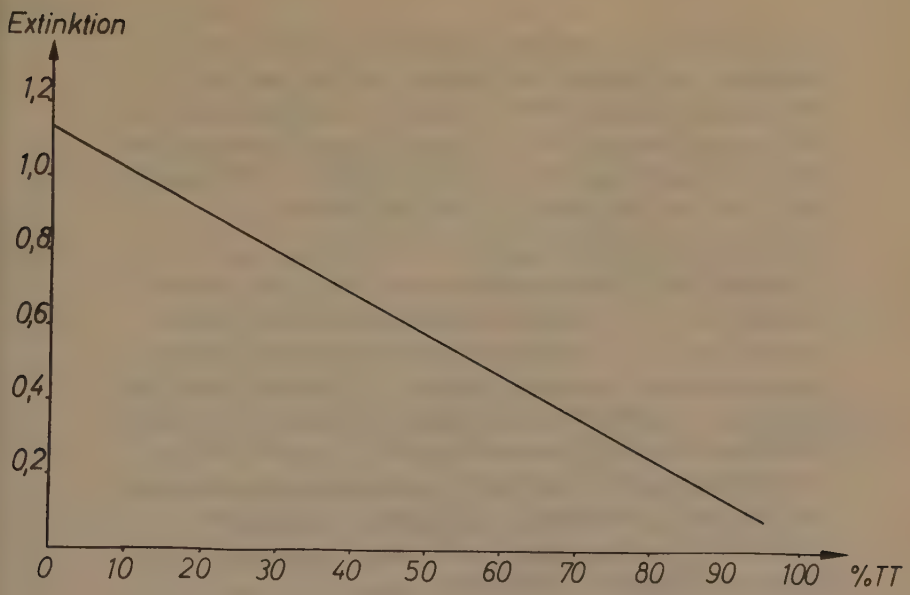

Abb. 17: Die Extinktion (Ordinate) in Abhängigkeit von der prozentualen Menge an TT (Abszisse)
Gesamtkonzentration = 17,1 µg/ml T + TT
Wellenlänge = 264 nm
Temperatur = 23°C±1
pH = 5,5

4.4 pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch Röntgenstrahlen in vitro

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin bei variabler Dosis untersucht, um einen Überblick über das Ausmass der Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch 130 kV Röntgenstrahlen zu bekommen. Es wurden Plexiglasschalen mit einer wässrigen dimeren Thyminlösung, die 17,1 µg TT pro ml vor der Bestrahlung ohne Pufferzusatz enthielten bei einer mittleren Dosis-

leistung von 119 rad/sec zwischen 0 und 30 min bestrahlt. Der pH-Wert der Lösung war 6,1 und die Temperatur betrug 23°C±1. Die Proben wurden während der Bestrahlung gerührt und nach der Bestrahlung erhitzt. (Begründung 4.4.3) Danach wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 264 nm gemessen.

Abbildung 18 zeigt, dass bei einer Dosis von 37,45Krad ein Spaltungsmaximum von 94,2 TT % eingetreten ist. Bei längerer Bestrahlung nimmt die Extinktion ab, d.h. die strahlenchemische Veränderung des gebildeten monomeren Thymins ist grösser als die Menge des neugebildeten monomeren Thymins. In einer wässrigen dimeren Thyminlösung (17,1 µg/ml TT) mit Pufferzusatz liegt das Spaltungsmaximum bei höheren Dosiswerten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Abhängigkeit der Spaltung des dimeren Thymins von der Dosis nicht untersucht werden.

4.4.1 Bestimmung des Extinktions-Kurvenverlaufs bei der Spaltung von dimerem Thymin in Abhängigkeit vom pH-Wert

Für pH-Änderungen in den wässrigen dimeren Thyminlösungen wurden diese mit einem Citrat-Phosphat-Borat-Puffer auf pH-Werte zwischen 2,9 und 11,1 eingestellt. Die Proben von 10 ml Lösung enthielten vor der Bestrahlung 17,1 µg/ml dimeres Thymin und keine nachweisbare Menge an monomerem Thymin. Es wurde mit den Dosen von 44,9, 174,9 und 224,7 krad bestrahlt. Die Proben wurden während der Bestrahlung gerührt und hatten eine Temperatur von 23°C±1. 5 min nach der Bestrahlung wurden die Extinktionen der Proben bei einer Wellenlänge von 264 nm spektralphotometrisch gemessen. Nach dem Erhitzen (5 min, 100°C) wurden die Proben wiederum gemessen.

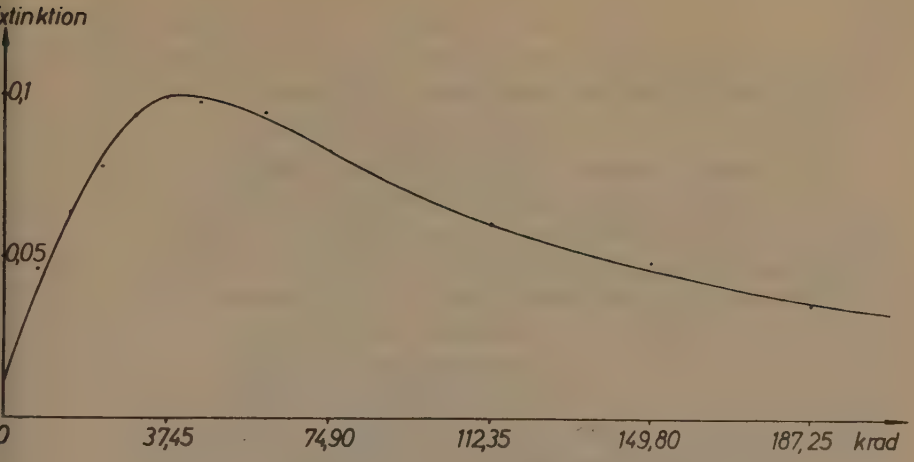

Abb. 18: Verlauf der Spaltung von TT gemessen als Extinktionsänderung (Ordinate) in Abhängigkeit von der Dosis (Abszisse)
Anfangs-Konzentration = 17,1 µg/ml TT
Dosisleistung = 118,9 rad/sec
Wellenlänge = 264 nm
Temperatur = 23°C±1
pH = 6,1

In Abbildung 19 geben die Kurven A,B und C den Verlauf der Spaltung des dimeren Thymins nach Applikation von 44,97, 74,9 und 224,7 krad einer 130 kV-Röntgenstrahlung wieder. Es zeigt sich, dass im sauren und alkalischen Bereich die Spaltung geringer ist als im neutralen. Im Bereich von pH 6 und pH 8 finden sich Spaltungsmaxima von dimerem Thymin. Die Kurve D zeigt den Verlauf der Spaltung des dimeren Thymins nach 224,7 krad Bestrahlung, wobei die Extinktion 5 min nach der Bestrahlung ohne vorheriges Erhitzen gemessen wurde.

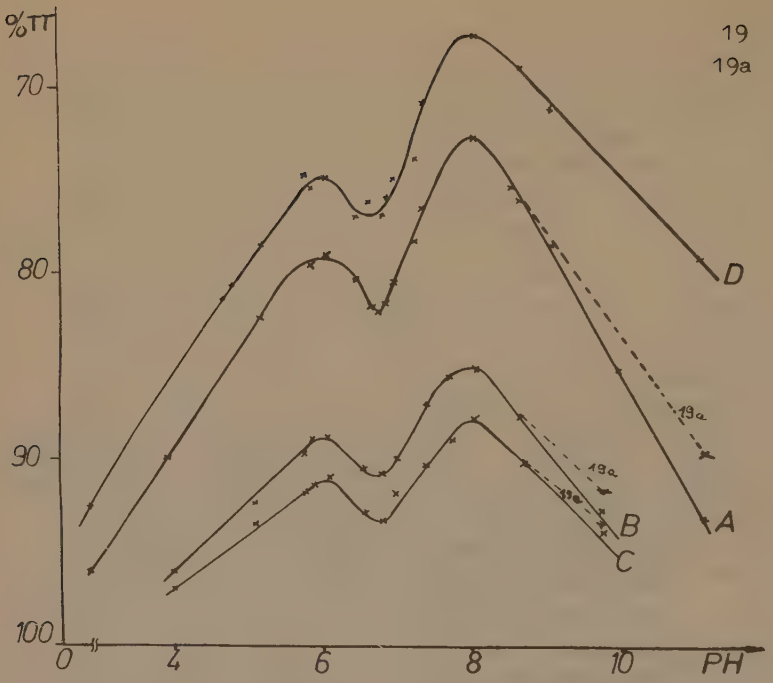

Abb. 19: Die pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch Röntgenstrahlen

Ordinate: TT % Abszisse: pH-Wert

Kurve A = 224,7 krad nach der Röntgenbestrahlung erhitzt

" B = 74,9 " "

" C = 44,97 " "

" D = 224,7 " nach der Röntgenbestrahlung nicht erhitzt

Anfangskonzentration = 17,1 µg/ml TT

Temperatur = 23°C±1

Wellenlänge zur Bestimmung des TT-Gehalts = 264 nm

Abb. 19 a: Die pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch Röntgenstrahlen unter Berücksichtigung der pH-abhängigen Eigenextinktion von T und TT (S.26 a, Abb. 14 a)

4.4.2 Der Einfluss verschiedener Pufferlösungen bezw. verschiedener Konzentrationen der Pufferlösungen auf die Spaltung von dimerem Thymin

Es wurden wässrige dimere Thyminlösungen mit HCl- KCl-Pufferlösungen auf pH-Werte zwischen 2,1 und 3,55 eingestellt. Die Proben enthielten wiederum 17,1 µg/ml dimeres Thymin vor der Bestrahlung. Proben von 10 ml mit Puffer-Normalitäten -Molaritäten von 0,1, 0,2 und 0,3 wurden mit einer Dosis von 224,7 krad bestrahlt.
Abbildung 20 zeigt, dass mit steigender Konzentration der Pufferlösung eine grössere Spaltung des dimeren Thymins erreicht wird. Die Bestrahlung in 0,3 normalem HCl- KCl- Puffer ergab ähnliche Spaltungseffekte wie die in Citrat- Phosphat- Borat-Puffer mit einer Normalität bezw. Molarität von ca. 0,2 bis 0,3.

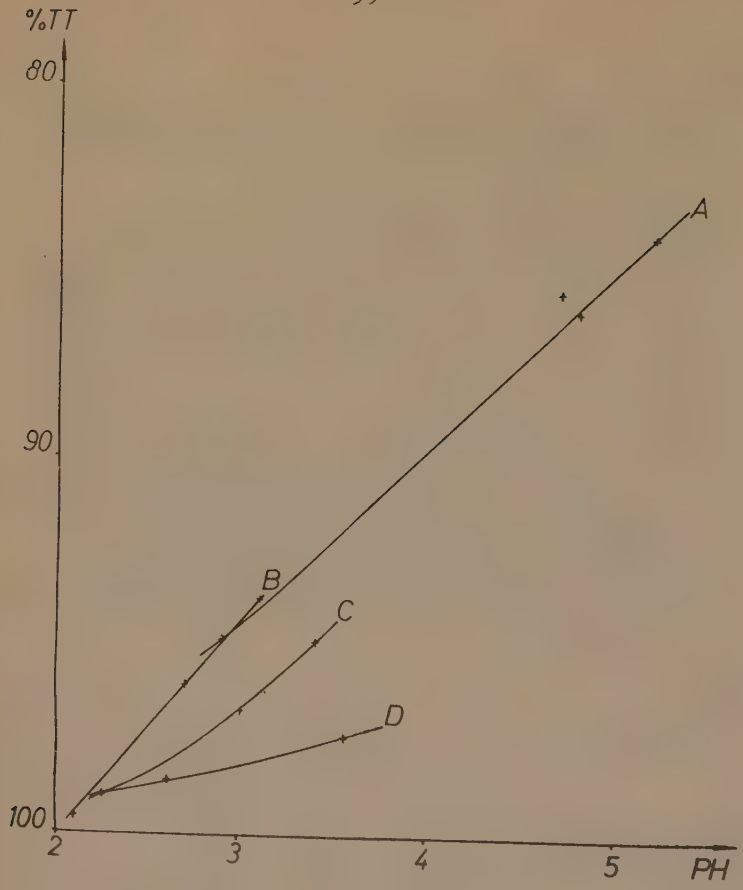

Abb.20: Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch konstante Dosen von Röntgenstrahlen bei unterschiedlichen Pufferlösungen bezw. Pufferkonzentrationen vom pH-Wert

Kurve A = Citrat- Phosphat- Borat- Puffer
" B = 0,3 n HCl - KCl - Puffer
" C = 0,2 n " " "
" D = 0,1 n " " "

Wellenlänge zur Bestimmung des TT-Gehaltes	= 264 nm
Konzentration	= 17,1 µg/ml TT
Temperatur	= 23°C±1
Dosis	= 224,7 krad

4.4.3 Bestimmung der Faktoren, die einen Extinktionsanstieg nach Röntgenbestrahlung bewirken

Wurde die Extinktion der Proben nach der Bestrahlung in bestimmten Zeitintervallen gemessen, so zeigte sich ein Extinktionsanstieg mit fortschreitender Zeit. Dieser Anstieg hatte sein Maximum ca.eine Stunde nach der Bestrahlung. Es könnten also bei der Bestrahlung sekundäre Bestrahlungsprodukte entstanden sein, die den Extinktionsanstieg bewirken. Um diese Erscheinung zu klären, sind folgende Versuche durchgeführt worden:

a) Um zu prüfen, ob das Lösungsmittel Aqua tridest durch die Bestrahlung einer Veränderung unterliegt, die sich als Extinktionsanstieg zeigt, wurde das Lösungsmittel mit einer Dosis von 224,7 krad bestrahlt. Es zeigte sich, dass nach der Bestrahlung mit dieser Dosis keine Extinktionsänderung über ein Zeitintervall von einer Stunde eintrat.

b) Um zu klären, ob aus den Bestrahlungsgefässen (Plexiglas) Stoffe durch die Bestrahlung freigesetzt werden, die eine Extinktionsänderung bewirken, wurde Aqua tridest sowohl in Plexiglasschalen als auch in Glasschalen bestrahlt. Es zeigte sich keine Extinktionsänderung.

c) Es wurde geprüft, ob durch Rühren eine Extinktionsänderung erzielt werden könnte. Die Lösung wurde dazu 30 min wie im Versuch gerührt. Es zeigte sich keine Extinktionsänderung.

d) Um zu prüfen, ob die Pufferlösung (Citrat- Phosphat- Borat- Puffer) durch die Bestrahlung verändert würde, wurden Proben mit 10 ml Lösung, die 30 ml Aqua tridest und 5 ml Puffer enthielten verschiedene Zeiten bestrahlt. Es zeigte sich, dass die Extinktion durch die Bestrahlung anstieg im Gegensatz zur

unbestrahlten Probe. Während einer Stunde nach der Bestrahlung stieg die Extinktion weiterhin an. Daraufhin wurden die Proben erhitzt, wobei die Extinktion auf den Wert vor der Bestrahlung absank. Es sind also bei der Bestrahlung an den Substanzen der Pufferlösung Veränderungen hervorgerufen worden, die hitzeinstabil bezw. flüchtig sind.

e) Es wurden die einzelnen Puffersubstanzen des Citrat- Phosphat- Borat- Puffers getrennt bestrahlt. Dabei zeigte sich, dass eine 0,1 n Na- Citrat-Lösung einen starken Extinktionsanstieg durch die Bestrahlung erfuhr, der nach dem Erhitzen nicht mehr zu registrieren war. Nach dem Erhitzen war auch zu einem späteren Zeitpunkt keine Extinktionsänderung messbar.

Da Thymin und dimeres Thymin weitgehend hitze- und säurestabil sind, wurden die Proben nach der Röntgenbestrahlung erhitzt (5 min, 100°C), um reproduzierbare Werte zu erhalten. Die Kurven A und D in Abbildung 19 zeigen deutlich den Extinktionsunterschied einer 17,1 µg/ml dimeren Thyminlösung, die 5 min nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 224,7 krad gemessen wurde. In Kurve D wurden die Proben 5 min nach der Bestrahlung ohne vorheriges Erhitzen spektralphotometrisch bei 264 nm gemessen. In Kurve A wurden die gleichen Proben nach der Bestrahlung erhitzt und danach gemessen. Es ist ein deutlicher Unterschied festzustellen.

4.5 Polynom-Näherung für die pH-abhängige strahleninduzierte Dimerenspaltung nach der Methode der kleinsten Fehler-Quadrate

Für die in 4.4.1, Abb.19, Kurve A ermittelte pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch Röntgenstrahlen wurde ein Regressionspolynom bestimmt.
Die Tabelle II zeigt die Versuchsergebnisse.

pH	Versuch Nr. 1 (E)	1 (TT%)	2 (E)	2 (TT%)	3 (E)	3 (TT%)	Mittelwert TT%
2,9	0,070	96,94	0,080	96,02	0,090	95,10	96,02
4,7	0,200	85,00	0,190	85,98	0,180	86,89	85,85
4,8	0,180	86,89	0,191	85,88	0,214	83,79	85,62
5,2	0,240	81,41	0,223	82,96	0,218	83,42	82,59
5,8	0,258	79,77	0,258	79,77	0,258	79,77	79,77
5,9	0,262	79,41	0,259	79,68	0,256	79,95	79,68
6,1	0,264	79,22	0,266	79,04	0,262	79,41	79,22
6,5	0,256	80,50	0,240	81,41	0,266	79,59	80,50
6,7	0,247	80,77	0,224	82,87	0,234	81,96	81,86
6,8	0,234	81,96	0,234	81,96	0,231	82,23	82,05
6,9	0,236	81,78	0,236	81,78	0,236	81,78	81,78
7,0	0,259	79,68	0,235	81,87	0,253	80,23	80,59
7,3	0,273	78,40	0,273	78,40	0,273	78,40	78,40
7,4	0,291	76,76	0,287	77,12	0,298	76,12	76,66
8,1	0,330	73,20	0,348	71,56	0,324	73,75	72,83
8,6	0,300	75,94	0,316	75,03	0,305	75,48	75,48
8,7	0,300	75,94	0,388	77,03	0,300	75,94	76,30
9,1	0,270	78,68	0,270	78,68	0,270	78,68	78,68
11,1	0,117	92,64	0,100	94,19	0,110	93,28	93,37

Tab.II: Die Extinktion (E) bei verschiedenen pH-Werten und die dazu aus der Eichkurve (Abb.16,S.32) ermittelte Menge an TT %, sowie der Mittelwert von TT % aus 3 Versuchen. Bedingungen wie bei Abb.19, S.37.

Aus den gemessenen Extinktionswerten (Tab.II) bei einem bestimmten pH-Wert wurde mit Hilfe der Eichkurven der prozentuale Anteil an TT bestimmt (4.3). Durch die so ermittelten Werte wurde nach der Methode der kleinsten Fehler-Quadrate ein Regressionspolynom gelegt (Berechnung erfolgte auf einem Computer (4.3)). Als günstige Näherung erwies sich das Polynom 8-ten Grades.

$$y = a_8 x^8 + a_7 x^7 + a_6 x^6 + a_5 x^5 + a_4 x^4 + a_3 x^3 + a_2 x^2 + a_1 x^1 + a_0 \qquad \text{(Formel 2)}$$

y = TT% x = pH

Tabelle III zeigt die Computer-Berechnung für das Polynom 8-ten Grades.

NAEHERUNG 8 -TEN GRADES ERGIBT DEN BESTIMMTHEITS-INDEX .994793

TERM	KOEFFIZIENT
0	7.4981852E+04
1	-1.1223496E+05
2	5.9344845E+04
3	-1.9157911E+04
4	3.7715863E+03
5	-4.6443690E+02
6	3.4981971E+01
7	-1.4752174E+00
8	2.6693506E-02

X - TATS.	Y - TATS.	Y - BERECHN.	DIFFERENZ	PROZ. DIFF.
2.9	96.32	96.32006	-6.29902E-04	-6.56007E-04
4.7	85.85	85.7317	.11831	.13801
4.8	85.62	85.7527	-.132686	-.154731
5.2	82.59	82.6941	-.104092	-.125876
5.8	79.77	79.3137	.456279	.575284
5.9	79.68	79.3806	.299385	.377151
6.1	79.22	79.9103	-.690278	-.863817
6.5	80.5	81.3553	-.855347	-1.05137
6.7	81.86	81.5828	.277236	.339822
6.8	82.05	81.4597	.590283	.724632
6.9	81.78	81.1652	.614839	.757516
7	80.59	80.6958	-.105801	-.131111
7.3	78.4	78.3859	1.41357E-02	1.80335E-02
7.4	76.66	77.4033	-.74332	-.960321
8.1	72.83	72.5447	.285322	.393305
8.6	75.48	75.4309	4.90917E-02	6.50817E-02
8.7	76.3	76.4727	-.172656	-.225775
9.1	78.68	78.6488	3.11962E-02	3.96652E-02
11.1	93.37	93.3564	1.35546E-02	1.45192E-02

Tab.III: Regressionspolynom 8-ten Grades

Term 0 - 8 = errechnete Koeffizienten für $a_0 - a_8$

x - Tats. = pH
y - Tats. = TT %
y - Berechn. = TT % Berechnung nach Formel 2
Differenz = Differenz aus gemessenen u. errechneten TT %

(7,4981852E+Ø4 = 74981,852
2,6693506E-Ø2 = 0,026693506)

Die Abbildung 21 zeigt die Messpunkte (ein Messwert ist stets der Mittelwert aus 3 Messungen) und das Näherungspolynom. In dem betrachteten pH-Bereich weist das Polynom ähnliche Extremwerte auf, wie sie aus den diskreten Messpunkten vermutet werden können.

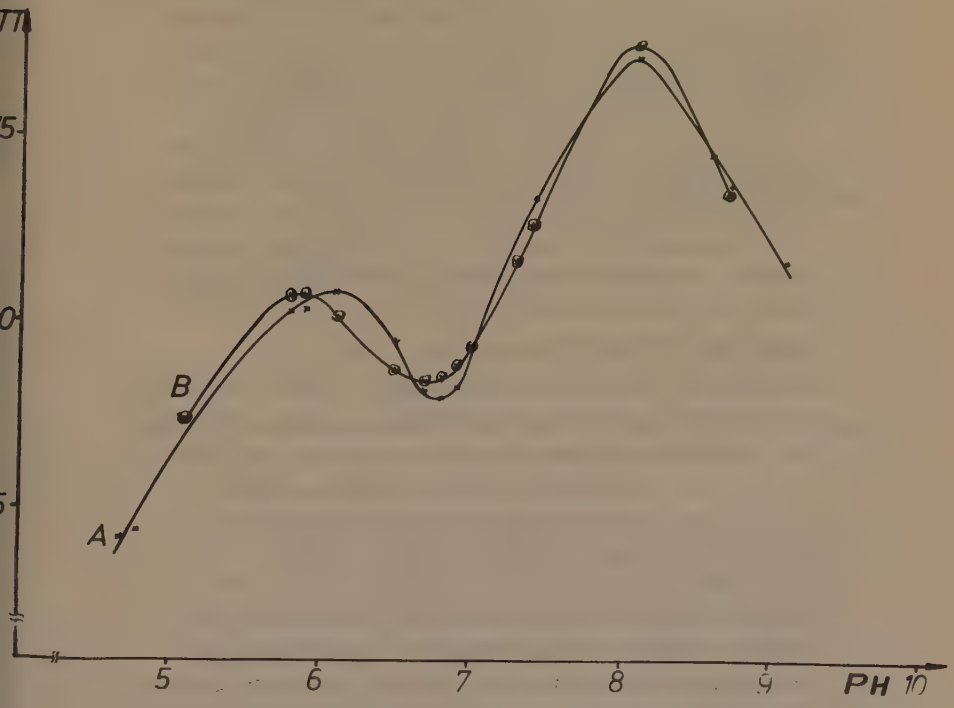

Abb.21: Die pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch Röntgenstrahlen 224,7 krad (Ordinate TT %, Abszisse pH)
Kurve A = individuelle Verbindung der Messpunkte (ein Messwert ist Mittelwert aus 3 Messungen)
Kurve B = Regressionspolynom 8-ten Grades

5. Diskussion der eigenen Versuchsergebnisse

5.1 Eichkurven zur spektralphotometrischen Bestimmung von monomerem und dimerem Thymin in wässrigen Lösungen

Johnes et al.(31) berechneten 1962 die quantitative Ausbeute bei der Bildung von TT aus T durch UV-Licht bestimmter Wellenlängen. Ausgehend von dieser Arbeit konnte experimentell die quantitative Ausbeute bei der Bildung von TT aus T durch UV-Licht durch Aufstellung von Eichkurven dargestellt werden. Weiterhin konnten Eichkurven aufgestellt werden, aus denen bei Kenntnis der Konzentration einer T- oder TT-Lösung und deren Extinktion, die prozentualen Anteile von T oder TT abgelesen werden können.

Bei der Wahl der Methodik wurde der spektralphotometrischen Auswertung der Vorrang gegeben. Im Gegensatz zur chromatographischen Auswertung hat diese den Vorteil grösserer Messgenauigkeit, soweit es sich um Gemische zweier Reinsubstanzen handelt. Aus Untersuchungen anderer Autoren (15, 16, 39) ist bekannt, dass bei Bestrahlung mit 76 krad Röntgenstrahlen maximal 4 % des Thymins zu Harnstoff zersetzt werden, wobei die Entstehung von Harnstoff pH-abhängig ist. Ausser Harnstoff entstehen hitzeinstabile Hydroperoxide. Es wird angenommen, dass vor der Aufspaltung bezw. Veränderung des Pyrimidinringes eine Spaltung des Cyclobutanringes eintreten muss. Danach ist zu erwarten, dass das bei der Spaltung von TT entstandene T überwiegt und nicht die bei der Spaltung entstandenen Nebenprodukte. Ausserdem wurde die eingestrahlte Röntgendosis klein gehalten. Zersetzungsprodukte des T waren in keinem Falle nachweisbar. Bei allen Versuchen mussten

Substanzen, Lösungsmittel und Geräte einen extremen Reinheitsgrad aufweisen, da anderenfalls mit unspezifischen Extinktionen zu rechnen ist.

5.2 pH-Abhängigkeit der Spaltung von dimerem Thymin durch Röntgenstrahlen

Bei der Betrachtung der Kurven (Abb.19,S.37), die die pH-Abhängigkeit der Spaltung von TT durch Röntgenstrahlen wiedergeben, fallen folgende Punkte auf, die zu diskutieren wären:

1. Die Entstehung von Thymin aus der dimeren Verbindung durch 130 kV Röntgenstrahlen ist pH-abhängig.
2. Mit zunehmender Dosis steigt der Anteil von monomerem Thymin.
3. Im stark sauren und im stark alkalischen pH-Bereich wird die Spaltung von TT gehemmt.
4. Die pH-abhängige Bildung von monomerem Thymin unter 130 kV Röntgenstrahlung weist zwei Maxima bei pH 6 und pH 8 auf.
5. Durch Erhitzen der Proben nach der Röntgenbestrahlung zeigt sich ein Extinktionsverlust.
6. Mit steigender Normalität der Pufferzusätze steigt der Anteil von monomerem Thymin.

Um den pH-Wert einer Lösung zu ändern ist die Zugabe von Elektrolyten notwendig. Bei der Verwendung eines Puffers, dessen Anteile bei etwa gleicher Ionenstärke variert werden können, wird auch die Zusammensetzung der zu untersuchenden Lösung bei der pH-Änderung beeinflusst. Aus den Arbeiten von Lochmann und Mitarbeitern (32) ist ersichtlich, dass theoretisch jede Ionenart einen Schutzeffekt auf zu bestrahlende Substanzen haben kann. Es erhebt sich bei der Bestrahlung von Substanzen unter Verwendung des pH-Wertes die Frage, ob die erhaltenen Ergebnisse der unterschiedlichen TT-Spaltung

auf pH-Änderungen beruhen oder ob durch Milieuänderungen unterschiedliche Schutzeffekte erzielt werden.

Nach Fahr (33) 1968 ist die Beständigkeit der Bestrahlungsprodukte des Wassers pH-abhängig. Da bei den vorliegenden Versuchen in wässrigen Lösungen unterschiedlicher pH-Werte bestrahlt wurde, kann das Milieu einen Einfluss auf die Bildung der Bestrahlungsprodukte haben. Im alkalischen Bereich werden unter O_2-Zutritt besonders die reaktiven Partikel von HOO°, H_2O_2 und HO° entstehen.

Nach Priess und Zillig(34) werden Uracil- und Thymin-Verbindungen im alkalischen pH-Bereich in starker direkter pH-Abhängigkeit von H_2O_2 angegriffen.

Buxton teilte 1966 mit (35), dass die strahlenchemische Reaktion pH-abhängig ist und dass die Zahl der anwesenden H-Ionen bei der Ausbeute an Wasserradikalen besonders im sauren und alkalischen pH-Bereich ins Gewicht fallen.

Die zunehmende Monomerisation von TT mit steigender Röntgendosis wurde von Lochmann 1963 (16) beobachtet. Diese Beobachtung stimmt mit den eigenen Befunden überein.

Das Auftreten der beiden Maxima könnte folgendermassen gedeutet werden:
Die beiden Spaltungsmaxima fallen mit den Stabilitätsmaxima von Bestrahlungsprodukten des Wassers zusammen. Die Abhängigkeit der Stabilität vom pH-Wert ist für eine Reihe von Produkten nachgewiesen worden. So könnten z.B. bei pH 6 die OH-Radikale und pH 8 die HOO-Radikale Wirkungsmaxima bei der TT-Spaltung aufweisen. Die beobachteten Effekte bei der Bestrahlung der monomeren Pyrimidine sind jedoch unterschiedlich.

Von Bedeutung für die Entstehung der Maxima ist der Cyclobutanring als Angriffspunkt der Spaltung. Seine Stabilität dürfte von der Elektronenkonfiguration der Pyrimidinringe abhängen; dies ist wieder pH-abhängig. Das monomere Uracil und Thymin liegen im sauren pH-Bereich als Lactamform, im alkalischen pH-Bereich als Lactimform vor. (36) Durch Überlagerung beider Formen könnten die Spaltungsmaxima entstehen. Dass im pH-Bereich von 8 eine grössere Menge von T entsteht, ist evtl. darauf zurückzuführen, dass in diesem Bereich die grösste Stabilität der T-Moleküle vorliegt. Dabei ist das Lactim- Lactam- Gleichgewicht am weitesten zu Gunsten der Lactimform verschoben. Die Lactimform des Ringes ist wegen ihres benzolähnlichen Charakters sicher beständiger als die mehr einer Äthylenverbindung gleichende Lactamform. Diese Überlegung konnte von Ranadiv et al. 1956 (37) bestätigt werden. Sie konnten bei der Bestrahlung von wässrigen Pyrimidin-Lösungen mit 200 kV x-Strahlung feststellen, dass mit steigender Anzahl der Bindungen im Ring mit Äthylencharakter auch die Strahlungsempfindlichkeit ansteigt.

5.3 Der Einfluss verschiedener Pufferlösungen bezw. verschiedener Konzentrationen der Pufferlösungen auf die Spaltung von dimerem Thymin

Auf Grund der Versuche, die den Einfluss der Pufferlösungen und deren Konzentration auf die Spaltung des dimeren Thymins zeigen sollten, können folgende Aussagen gemacht werden:

Die Spaltung des dimeren Thymins nimmt mit steigender Ionenkonzentration der Pufferlösung bei konstantem pH-Wert zu. Andererseits ist bekannt, dass Schutzeffekte gegen die Strahlenwirkung durch Sulfhydrylgruppen, wie z.B. im Cystein und im

Cysteamin, eintreten können. Abgesehen von Schutzeffekten könnte mit steigender Ionenkonzentration die Entstehung reaktionsfähiger mesomerer Grenzformen begünstigt werden, soweit sie nicht ausschliesslich vom pH-Wert abhängig ist. Die entstandenen mesomeren Grenzformen werden möglicherweise besonders leicht durch die bei der Radiolyse des Wassers entstandenen Wasserradikale gespalten. Es könnte eine Spaltung durch direkte Elektronenwirkung eintreten.

Der bei den Versuchen verwendete Kaliumchlorid-Salzsäure Puffer nach Clark und Lubs wirkt durch die Veränderung der Cl^--Ionenkonzentration. Cl-Atome, die bei der Bestrahlung als sekundäre Produkte entstehen können, reagieren leicht mit Thymin und anderem organischen Material. Davon macht man bei der Dosismessung nach Fricke Gebrauch. Bei der Fricke-Dosimetrie, die auf der Umwandlung von Fe^{++} - in Fe^{+++} -Ionen beruht (Formel 3), wird der Fe^{++} -haltigen Lösung Chlorid zugesetzt, um den störenden Einfluss von organischem Material zu verringern. Dabei dürften z.B. folgende Reaktionen ablaufen:

$Fe^{++} + OH^{\cdot} \rightarrow Fe^{+++} + OH^-$ (Formel 3)

$R\text{-}SH + OH^{\cdot} \rightarrow R\text{-}S^{\cdot} + OH^- + H^+$ (Formel 4)

$Cl^- + OH^{\cdot} \rightarrow Cl^{\cdot} + OH^-$ (Formel 5)

$Fe^{++} + Cl^{\cdot} \rightarrow Fe^{+++} + Cl^-$ (Formel 6)

Die Radikale, die mit organischem Material reagieren sind für die Erzeugung von Fe^{+++}- aus Fe^{++}-Ionen und damit für einen Dosisnachweis verloren (Formel 4). Im Gegensatz dazu können die aus Cl^- -Ionen entstehenden Cl-Atome bezw. Cl_2-Moleküle (Formel 5) Fe^{++}-Ionen zu Fe^{+++}-Ionen oxydieren (Formel 6).

Beim Angriff auf den Thyminring fungieren die Cl-Anionen möglicherweise als Energieüberträger.

So ist es denkbar, dass das Cl^--Ion mit den aus der Radiolyse stammenden $OH^\cdot$-Radikalen reagiert, wobei das reaktionsfreudige Cl-Atom entstent. Das Cl-Atom könnte nun am Ringsystem vom dimeren Thymin angreifen, wobei es zur Veränderung des Pyrimidinringes kommen kann. Eine annähernd gleiche Tendenz zeigen Versuche, bei denen mit steigender Phosphat-Pufferkonzentration (Puffer nach Sörensen) ein Anstieg der Spaltung des dimeren Thymins zu erkennen war.

5.4 Bestimmung der Faktoren, die einen Extinktionsanstieg nach Röntgenbestrahlung bewirken

Scholes und Weis fanden 1960 (38), dass viele Substanzen in wässriger Lösung unter Sauerstoffsättigung, wenn sie irgendeiner Strahlung z.B. γ-Strahlung ausgesetzt wurden, die Fähigkeit haben, Hydroxy-hydroperoxid-Verbindungen zu bilden. So werden z.B. Hydroxy-hydroperoxide von Thymin und Uracil gebildet. Da das Hydroxy-hydroperoxid des Thymins in zwei unterschiedlichen Konfigurationen mit jeweils zwei stereoisomeren Formen vorliegt, können zwei 4-Hydroxy-5-hydroperoxid-Verbindungen bezw. die zwei 5-Hydroxy-4-hydroperoxid-Verbindungen des Thymins dargestellt werden. Scholes und Weis konnten eine Hydroxy-hydroperoxid-Bindung auch an Steroiden und Olefinen durch ionisierende Strahlung feststellen. Es kann deshalb angenommen werden, dass bei der Bestrahlung von Zitronensäure z.T. Peroxid-Verbindungen entstehen.

Von verschiedenen Autoren (39, 40, 41, 42) wurde festgestellt, dass bei der Oxydation der Zitronensäure Substanzen entstehen, die in der Tabelle IV zusammengefasst sind. Diese Substanzen haben UV-Extinktionsmaxima im Gebiet der angegebenen Wellenlängen (43, 44).

Oxydationsprodukte der Zitronensäure	UV-Extinktion im Bereich von (nm)
Aconitsäure	250 bis < 214
Acetondicarbonsäure	250 " < 214
Ameisensäure	155 " 110
Aceton	280 " 170
Formaldehyd	375 " 275
CO_2	625 " 325
H_2O	178 " 154
H_2O_2	290 " 220
Zitronensäure	250 " < 214

Tab.IV: Oxydationsprodukte der Zitronensäure (39, 40, 41, 42);UV-Extinktionen der Oxydationsprodukte (43, 44)

Aus Tabelle IV ist zu ersehen, dass H_2O_2 und Aceton in dem Wellenlängenbereich um 264 nm Extinktionsmaxima zeigen und wahrscheinlich für den Extinktionsanstieg nach Röntgenbetrahlung verantwortlich sind. Da die entstandenen Reaktionsprodukte hitzeinstabil sind, können sie durch Erhitzen nach der Bestrahlung ausgeschaltet werden. Der genaue Wirkungsmechanismus dieser reversiblen Extinktionsänderung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Durch spektralphotometrische Messungen wurden Eichkurven aufgestellt, aus denen die prozentualen Anteile von monomerem und dimerem Thymin durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 264 nm ermittelt werden konnten.

Durch Einwirkung von 130 kV-Röntgenstrahlen kommt es in luftgesättigter wässriger Lösung von dimerem Thymin zur Aufspaltung der dimeren in monomere Moleküle. Der Umfang der Monomerisation erwies sich bei konstanter applizierter Dosis (z.B.225 krad) als pH-abhängig. Spaltungsmaxima wurden bei pH 6,1 (z.B.79,2 TT %) und bei pH 8,1 (z.B.72,8 TT %) registriert. Zwischen den beiden Maxima liegt bei pH 6,8 (z.B. 82 TT %) ein Minimum der dimeren Spaltung. Im untersuchten sauren (pH 2,9) und alkalischen (pH 11,1) Bereich findet nur eine geringe Monomerisation statt (z.B.96,02 - 93,37 TT %). Ursachen für das Auftreten der Spaltungsmaxima werden diskutiert.

Für den experimentell ermittelten Kurvenverlauf der pH-abhängigen Monomerisation wurde mit Hilfe eines Computers ein Regressionspolynom 8.-Grades errechnet, das den Kurvenverlauf in günstiger Näherung wiedergibt.

7 Literaturnachweis

1 Watson, J.D.; F.H.Crick
Nature 171, 737 (1953)
Nature 171, 964 (1953)
Cold Spring Harbor.Symp. Quant. Biol.18, 123 (1953)

2 Karlson, P.
Lehrbuch der Biochemie
Verlag Georg Thieme,Stuttgart (1967)

3 Hartmann, D.
Die Spaltung von dimerem Thymin durch ionisierende Strahlung und ihre Auswirkung bei der Inaktivierung von Bakterien
Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin (1970)

4 Weinblum, D.
Strahlenchemische Reaktion von Nucleinsäure und Nucleinsäurekomponenten
Dissertation an der Techn.Universität Berlin (1961)

5 Rörsch, A.;R.Beukers; J.Ijlstra; W.Berends
The effect of ultraviolet light on some components of the nucleic acids
Rec. trav. chim. 77, 423 (1958)

6 Beukers,R.; J.Ijlstra; W.Berends
The effect of ultraviolet light on some components of the nucleic acids
Rec. trav. chim. 77, 729 (1958)

7 Beukers, R.; W.Berends
Isolation and identification of the irridation product of thymine
Biochim. Biophys. Acta 41,550 (1960)

8 Wulff, D.L.; G. Fraenkel
On the nature of thymine photoproduct
Biochim. Biophys. Acta 51, 332 (1961)

9 Dertinger, H.; H.Jung
Molekulare Strahlenbiologie
Springer-Verlag, Berlin (1969)

10 Baudisch, O.; W.L.Bass
J.Am.Chem.Soc. 46, 184 (1924)

11 Baudisch, O.; D.Davidson
J.Biol. Chem. 64, 233 (1925)

12 Wacker,A.; Gerstenberger, A.
Photoreaktivierung mit Wasserstoffperoxid
Angew.Chem. 75, 916 (1963)

13 Dellweg,H.; A.Wacker
Strahlenchemische Veränderungen von Thymin
und Cytosin in der DNS
Z.Naturforschg. 17b, 827 (1962)

14 Moore, A.M.
Ultraviolet Irradiation of Pyrimidine Derivatives
II.Note on the Synthesis of the Product of
Reversible Photolysis of Uracil
Can.J.Chem. 36, 281 (1958)

15 Lochmann, E.R.
Umwandlung von Thymin-2-C^{14} durch Röntgenstrahlen
in vitro und in vivo
Naturwiss.49, 158 (1962)

16 Lochmann, E.R.
Spaltung von Thymindimer in monomeres Thymin
durch Röntgenstrahlen
Naturwiss. 50, 474 (1963)

17 Schmidt,B.; D.Hartmann; K.Grossgebauer; W.Schumacher
Die Aufspaltung von dimerem Thymin in monomeres
durch ionisierende Strahlung
Naturwiss.50, 473 (1963)

18 Deering, R.A.; W.Snipes
γ-Irradiation of Thymine Dimers in Aqueous Solution
Biophys. J. 8, 326 (1968)

19 Schmidt, B.; D.Hartmann; K.Grossgebauer; W.Schumacher
Splitting of Uracil Dimer by High-energy Electrons
Nature 199, No.4892, 504 (1963)

20 Weinblum,D.
Radiolysis of the Dimers of Dimethylthymine in the Crystalline State
Rad.Res. 39, 731 (1969)

21 Wacker,A.; H.Dellweg; E.Lodemann
Strahlenchemische Veränderungen der Nucleinsäuren
Angew.Chem. 73, 64 (1961)

22 Setlow, R.B.; J.K.Setlow
Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage
Proc.Nat.Acad.Sci. 48, 1250 (1962)

23 Bollum,F.J.; R.B.Setlow
Ultraviolet inactivation of DNA primer activity
1.Effects of different wavelength and doses
Biochim. Biophys. Acta 68, 599 (1963)

24 Brookes,P.; P.D.Lawley
The reaction of mono- and difunctional alkylating agents with nucleic acids
Biochem.J. 80, 496 (1961)

25 Lawley, P.D.; P.Brookes
Molecular mechanism of the cytotoxic action of difunctional alkylating agents and resistance to this action
Nature 206, 480 (1965)

26 Dall'acqua,F.; S.Marciani; G.Rodighiero
Inter-strand cross-linkages occurring in the photoreaction between psoralen and DNA
North-Holland Publishing Company Amsterdam 2,121 (1970)

27 Hanawalt,P.C.; R.H.Haynes
Reparatur schadhafter Desoxyribonucleinsäure
Umschau in Wissensch.u.Technik 1967,Heft 17,S.553
Scient.American 216, 36 (1967)

28 Greulich,V.; D.Hartmann; B.Schmidt
Spaltung von dimerem Thymin in E.coli durch schnelle Elektronen
Z.Naturforschg. 23b, 755 (1968)

29 Weinblum,D.; H.E.Johns
Isolation and properties of isomeric Thymine-dimers
Biochim. Biophys. Acta 114, 450 (1966)

30 Documenta Geigy, Wissensch.Tabelle 6.Aufl.
J.R.Geigy AA, Pharmazeutische Abteilung
S.276,S.60

31 Johns,H.E.; S.A.Rapaport; M.Delbrück
Photochemistry of Thymine Dimers
J.Mol.Biol. 4, 104 (1962)

32 Lochmann, E.R.; D.Weinblum; A.Wacker
Strahlenwirkung und Strahlenschutz bei Röntgenbestrahlung von Nuclinsäuren
Biophys. 1, 396, (1964)

33 Fahr, E.
Untersuchungen über die chemischen Ursachen biologischer Strahlenschäden
Biophys. 5, 2 (1968)

34 Priess, H.; W.Zillig
Reaktionen von Wasserstoffperoxyd mit Nucleinsäurebausteinen und s-RNA
Z.physiol.Chemie 342, 73 (1965)

35 Buxton, G.V.
Rad.Res. 6, 423 (1966)

36 Weiss, J.J.
Chemical Effects of Ionizing Radiations on Nucleic-Acids and Related Compounds
Progr. Nucl.Acid. Res.Mol.Biol. 3, 103 (1964)

37 Ranadive,N.S.; K.S.Korgaonhor, M.B.Saharrabude
Proc.1st Intern.Conf.Peaceful Uses At.Energy
Vol.2,299(1956)

38 Scholes, G.; J.Weiss; C.M.Wheeler
Radiation Chemistry.
Organic Hydroxy-Hydroperoxides: a class of hydroperoxides formed under the influence of ionizing radiations
Nature 185, 305 (1960)

39 Palit; Dhar
Experiments with aqueous solution of organic acids in presence of sunlight
J.phys.chem. 34, 995 (1930)

40 Heimrod, G.W.; P.A. Levene
Oxydation organischer Substanzen mit alkalischem Wasserstoffperoxyd
Bio.Z.29, 56 (1910)

41 Huebner; Ames; Bubl
Oxidation of Citric acid
Am.Soc. 68, 1622 (1946)

42 Kuyper
Oxydation der Zitronensäure mit $KMnO_4$ in schwefelsaurer Lösung
Am.Soc. 55, 1723 (1933)

43 Landholt Börnstein
Band I,Teil 3

44 Bielecki,J.; V.Henri
Quantitative Untersuchungen über die Absorption ultravioletter Strahlen durch gesättigte und ungesättigte Säuren der Fettreihe
Ber.dtsch.chem.Ges. 46, 2590 (1913)

45 Wacker, A.; H.Dellweg; L.Träger; A.Kornhauser; E,Lodemann; G.Türck; R.Selzer; P.Chandra; M.Ishimoto
Organic Photochem.of Nucleic Acids
Photochem.et Photobiol. 3, 369 (1964)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Dieter Hartmann für seine grosszügige Unterstützung bei dieser Arbeit meinen besonderen Dank sagen.

Gleichzeitig danke ich Frau Dipl.-Ing.Katharina Schmidt und Herrn Dipl.-Ing. Berndt Förster für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Computer-Rechnungen.

Lebenslauf

Am 1.10.1944 wurde ich, Ralf Förster, als zweiter Sohn des Dipl.-Ing.Johannes Förster und dessen Ehefrau Hildegard geb.Clausnitzer in Dresden geboren. Von 1951 bis 1966 besuchte ich die Schule mit Abschluss der Reifeprüfung im März 1966 an der Evangelischen Schule Berlin-Frohnau.
Im November 1966 wurde ich an der Freien Universität Berlin im Studienfach Zahnmedizin immatrikuliert. Das Vorphysikum bestand ich im August 1967, das Physikum im März 1969. Im Januar 1972 schloss ich das Zahnmedizinstudium mit dem Staatsexamen ab.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31